REALE ACCADEMIA DELLE SCIENZE DI TORINO
(Anno 1908-909)

CONTRIBUTO ALLA CONOSCENZA DELL'ISTOGENESI

DELLE

FIBRE COLLAGENE

RICERCHE

DEL

Dott. ANGELO CESARE BRUNI

SETTORE

(con una tavola)



TORINO
VINCENZO BONA
Tipografo di S. M. e dei RR. Principi.
1909

REALE ACCADEMIA DELLE SCIENZE DI TORINO

(Anno 1908-909)

CONTRIBUTO ALLA CONOSCENZA DELL'ISTOGENESI

DELLE

FIBRE COLLAGENE

RICERCHE

DEL

Dott. ANGELO CESARE BRUNI

SETTORE

(CON UNA TAVOLA)



TORINO

VINCENZO BONA

Tipografo di S. M. e dei RR. Principi.

1909

Estr. dagli *Atti della R. Accademia delle Scienze di Torino*, Vol. XLIV.
Adunanza del 10 Gennaio 1909.

Nel corso di una serie di osservazioni sui tessuti connettivi, iniziate per consiglio del mio illustre Maestro, prof. ROMEO FUSARI, mi accadde di osservare alcune particolarità degne di nota nell'istogenesi del *ligamentum intervertebrale*, particolarità che mi pare possano portare qualche luce nella questione tuttora aperta dello sviluppo delle fibre collagene.

Perchè se le opposte opinioni sull'origine intracellulare (SCHWANN, VALENTIN, KUSNETZOFF, OBERSTEINER, ROBIN, BOLL, FLEMMING, REINKE, SPULER, ZACHARIADÈS, MAXIMOW, PES, ecc.), od estracellulare (HENLE, BRUCH, KILIAN, V. HESSLING, DRUMMOND, ROLLET, RANVIER, KOLLMANN, OGNEW, KÖLLIKER, MERKEL, EBNER, RENAUT, ecc.) delle fibre collagene parvero conciliate col sorgere della teoria dell'*ectoplasma*, parecchie divergenze esistono ancora, specialmente sul modo di considerare l'ectoplasma stesso.

Però alla scienza fu conquistato un fatto positivo di grande importanza con la dimostrazione che la sostanza fondamentale degli antichi AA. ha valore di protoplasma più o meno differenziato (*metaplasma* di HEIDENHAIN) e così la principale barriera che separava le due teorie sulla genesi della fibra collagena fu abbattuta. Già ROLLET aveva molto chiaramente espressa questa opinione, ma essa venne riportata ad onore in questi ultimi tempi, specialmente per opera di WALDEYER, di EBNER, di RETTERER, di HANSEN, di STUDNICKA, di SCHAFFER, di MALL e specialmente di M. HEIDENHAIN, e si può ora ritenere generalmente ammessa.

A parte la questione dell'opportunità delle denominazioni di *endo-* ed *ectoplasma*, negata da RETTERER, da LAGUESSE, da

EBNER, sta il fatto che oggi la tendenza predominante è di considerare la fibra collagena come formatasi nella parte periferica della cellula, non direttamente da elementi fibrillari costitutivi del protoplasma cellulare (FLEMMING), ma indirettamente per trasformazione del protoplasma, appunto secondo l'antico concetto di ROLLET. Salvo i particolari, si esprimono in questo senso HANSEN (1899), REINKE (1901), LAGUESSE (1903-04), RETTERER (1905), GOLOWINSKI (1907), PETERSEN (1908); SPALTEHOLZ (1906) invece in base alle sue ricerche sullo sviluppo dei tendini conserva l'opinione che le fibre collagene siano da considerarsi come " parte costitutiva delle cellule che le circondano ". Ad ogni modo per tutti questi AA. la cellula è sempre il punto di partenza per la formazione delle fibre.

EBNER (1897-1906) si scosta da essi, poichè dimostra per alcuni organi speciali (astuccio della corda nei pesci inferiori, fibrille connettive del dente) l'origine delle fibre nella sostanza fondamentale, intesa però come *metaplasma*, lontano da ogni cellula, specialmente per azione delle sollecitazioni meccaniche. Questo A., fondandosi su fatti speciali consimili di fibrillazione, che si osservano nei vegetali e in certi organi di animali invertebrati (involucro chitinoso), tende a generalizzare i suoi reperti per spiegare l'origine di tutte le fibre collagene.

Per HANSEN è *ectoplasma* quella parte periferica della cellula, che assume la funzione di formare fibrille collagene nel connettivo fibroso, o di formare sostanza fondamentale nella cartilagine jalina; esso si produrrebbe per differenziazione del protoplasma cellulare; la parte di quest'ultimo che non si differenzia costituirebbe l'*endoplasma*. Tale concetto, osserva giustamente EBNER, è affatto diverso da quello, secondo cui l'ectoplasma è inteso da MALL e da STUDNICKA. Secondo questi AA. il punto di partenza pei varii tessuti connettivi è, come del resto aveva già dimostrato RETTERER, un sincizio, proveniente dalla fusione in un protoplasma comune del protoplasma delle primitive cellule mesenchimali individualizzate.

MALL considera come *endoplasma* quella parte del simplasma, che assume un aspetto granuloso e circonda il nucleo; come *ectoplasma* la rimanente parte, che si differenzia in una rete fibrillare.

STUDNICKA mi pare concilii in parte le opinioni di HANSEN

e di MALL, poichè dà valore di *ectoplasma* alle parti periferiche delle trabecole della rete protoplasmatica sinciziale, in cui si raccolgono le fibre; considera poi come sostanza fondamentale amorfa o meglio come *Interzellularflüssigkeit* il contenuto delle maglie, in cui verranno anche sospinte col progredire dello sviluppo le fibre collagene.

RETTERER, nel 1905, riassume le sue vedute sull'origine delle fibrille connettive distinguendo tre periodi successivi: 1° la formazione di un *plasmodio* (*sincizio* degli altri AA.); 2° trasformazione del plasma perinucleare in sostanza granulosa *cromofila*, che si continua attraverso tutta la massa con prolungamenti anastomotici (*endoplasma* di MALL) formando una rete, le cui maglie sono riempite di *jaloplasma* (*ectoplasma*); 3° elaborazione nel jaloplasma per addensamento e differenzazione di fibrille connettive. Salvo la nomenclatura ciò si accorda abbastanza con lo schema di STUDNICKA; di più vi è tenuto conto dello stato amorfo dell'ectoplasma che precede la formazione delle fibrille, su cui LAGUESSE ha richiamato l'attenzione.

La denominazione di *ectoplasma* nel senso di MALL (come quella di *jaloplasma* nel senso di RETTERER) corrisponde assai bene alla denominazione di *metaplasma* introdotta da HEIDENHAIN; con essa l'A. riassume in una sola parola il concetto di WALDEYER che la sostanza fondamentale derivi da metamorfosi del protoplasma, non da secrezione. Nel senso di HANSEN invece la parola *ectoplasma* indica soltanto la parte periferica della cellula, avente la proprietà di produrre gli elementi formati, che successivamente passano nella sostanza fondamentale (fibre collagene nel caso del tessuto connettivo fibroso).

A scanso di confusioni, dovendo riferire delle mie ricerche io mi atterrò alle denominazioni di *cellula* e *sostanza fondamentale*, e indicherò come *protoplasma* il plasma componente la cellula, come *metaplasma* quello componente la sostanza fondamentale.

***

Io ho seguito sistematicamente lo sviluppo del *lig. intervertebrale* delle prime vertebre lombari in 25 embrioni e feti

bovini, che, misurati freschi dal vertice alla radice della coda, presentavano le seguenti dimensioni:

I	mm.	21	VIII	mm.	76	XIV	mm.	132	XX	mm.	186
II	„	33	IX	„	87	XV	„	141	XXI	„	196
III	„	41	X	„	92	XVI	„	151	XXII	„	215
IV	„	44	XI	„	100	XVII	„	165	XXIII	„	220
V	„	49	XII	„	112	XVIII	„	172	XXIV	„	240
VI	„	55	XIII	„	120	XIX	„	176	XXV	„	250
VII	„	63									

È noto come appunto sui dischi intervertebrali di feti bovini assai più grossi (oltre i 40 cm.) Hansen abbia potuto mettere in rilievo le particolarità, su cui fondò la sua teoria dell'ectoplasma.

Come liquido fissatore ho usato prevalentemente quello di Zenker, altre volte mi sono servito delle miscele di Mingazzini o di Bouin (formolo picrico-acetico) o di Kleinenberg. Per la decalcificazione, ove mi occorse, feci uso dell'acido tricloroacetico. Ho eseguito sezioni frontali comprendenti anche i corpi vertebrali adiacenti, e sezioni trasversali. Come metodi di colorazione ho scelto quelli che furono proposti come elettivi pel tessuto connettivo, e cioè la picrofucsina di Hansen, la miscela di Mallory (fucsina, Methylwasserblau, orange), l'ematossilina fosfomolibdica di Mallory secondo la modificazione di Ribbert con o senza safranina base (Curtis), il metodo di Bielschowsky modificato da Levi pel tessuto connettivo. Eccellenti risultati ottenni dalla triplice colorazione di Flemming (safranina, violetto di genziana, orange) e più che tutto dall'ematossilina ferrica di Heidenhain, sostituendo al differenziamento in allume ferrico ammoniacale il differenziamento in picrofucsina di Hansen. Quest'ultimo metodo è senza dubbio quello che svela contemporaneamente e con grande chiarezza il maggior numero di particolarità.

Nei più piccoli degli embrioni da me esaminati (da mm. 21 a mm. 87) si può osservare come il disco intervertebrale consti di una cavità pressochè centrale, contenente i resti della corda dorsale, nettamente delimitata da alcuni sottili strati di fine fibrille ondulate, parallele fra di loro ed all'asse del rachide. All'intorno di questa cavità esiste una zona, ove, su sezioni

frontali (più opportune delle trasversali, in cui le cellule appaiono un po' appiattite e viste di coltello), spiccano scarsi nuclei grossi, irregolarmente ovali o tondeggianti, di cui alcuni sono in divisione cariocinetica. I nuclei sono circondati da uno strato irregolare, sempre assai sottile, di protoplasma reticolare, che costituisce dei corpi cellulari, provvisti di scarsi prolungamenti. Le cellule così formate, irregolarissime per forma e dimensioni, talvolta anastomizzate fra di loro, sono immerse in una sostanza fondamentale a struttura finemente fibrillare, anzi si può dire che la loro periferia in alcuni punti sfuma in questa sostanza. Per ciò si riceve molto chiara l'impressione che la cellula altro non sia che l'addensamento perinucleare di un protoplasma comune, di cui la rimanente parte ha subìto una trasformazione fibrillare; il che collimerebbe con quanto MALL ha potuto rilevare nei primi stadii dello sviluppo del connettivo in Anfibii e Mammiferi. In mezzo alla trama di finissime fibrille, assolutamente disordinate, che solo pallidamente si colorano coi coloranti specifici del collageno, ma che si mettono facilmente in evidenza con molti altri metodi, compaiono delle lamine, che si colorano elettivamente come collageno, esse pure disordinate (Fig. 1ª). Questo reperto deve essere paragonato a quello di RENAUT, che descrisse, parteggiando per l'origine estracellulare delle fibre collagene, la formazione di una tramula di fibrille elementari nella sostanza fondamentale, e il secondario ordinamento e accollamento di esse a costituire dei fasci. Noterò subito che la differenza essenziale consiste nel significato da attribuirsi alla sostanza intercellulare in cui la trama fibrillare sorge. Per RENAUT essa è la primitiva sostanza fondamentale mucosa; nei miei preparati il rapporto di continuità tra di essa e le cellule dimostra trattarsi di una parte differenziata del primitivo protoplasma comune (quale lo hanno descritto RETTERER e MALL in stadii assai più precoci), cioè di un *metaplasma*. Osserverò pure come il disordine con cui sorgono le prime fibrille e anche le prime lamine contrasti con l'opinione di EBNER che le sollecitazioni meccaniche siano, almeno in questo caso, il fattore determinante della produzione delle fibrille; più probabilmente tali sollecitazioni sono uno dei fattori per cui le lamine, una volta formate, si orientano.

Dalla zona pericordale, sempre su sezioni frontali, si passa

progressivamente alle parti periferiche del disco. I nuclei si fanno gradatamente più piccoli e più numerosi, acquistano una forma allungata, e si dispongono secondo un certo numero di archi concentrici, rivolti con la loro concavità verso la zona centrale. Analogamente si dispongono le lamine, sempre più numerose e più ordinate, mentre, verso la periferia, appaiono fra di esse delle fibre isolate, che pare si possano ritenere una differenziazione per scomposizione delle lamine stesse.

Negli embrioni più piccoli, giungendo alle zone affatto esterne, ove le cellule sono molto numerose, non troviamo più delle lamine, ma soltanto delle fibre, piuttosto grosse ed isolate, apparentemente disposte senz'ordine, come le cellule, per cui molte, colpite trasversalmente, appaiono in forma di punti. Negli embrioni un poco più avanzati (49 mm.) appare invece ben evidente in queste porzioni più periferiche una speciale disposizione, che, a parte i caratteri del tessuto, si può vedere descritta e figurata da Fick nel disco intervertebrale adulto dell'Uomo. Le cellule, di forma allungata con nucleo a bastoncino e protoplasma granulare, e le fibre hanno direzione tale che si incontrano tutte sotto un determinato angolo (non retto) lungo linee arciformi dirette come le prime lamine formatesi; cellule e fibre sono tagliate obliquamente in modo da dare un aspetto pennato molto regolare e caratteristico alla sezione di ogni strato. Nelle sezioni frontali così vicine alla superficie ventrale del disco da interessarne solo le parti più periferiche, le cellule, sempre allungatissime, appaiono tutte orientate secondo due direzioni incrociantisi ad angolo ottuso. Qui non abbiamo più nè lamine, nè fibrille elementari, ma solo delle fibre parallele alle cellule, alcune delle quali così aderenti per un certo tratto al corpo cellulare da parere quasi una parte di esso che se ne distacchi, come Zachariadès avrebbe visto nell'aponeurosi del ginocchio e nel connettivo posto sotto il tendine di Achille nella rana. Le fibre hanno due caratteristiche: 1° di essere isolate e non mai raccolte in fasci; 2° di non avere il decorso ondulato solito delle fibre dei fasci connettivi definitivi. L'intimo rapporto di alcune di esse con le cellule, preso a sè, potrebbe senz'altro esser ritenuto come prova evidente della diretta origine della fibra da una o più cellule anastomizzate (Fig. 2), ma vediamo che questa può essere semplicemente un'apparenza, se noi pa-

ragoniamo questo reperto all'altro, assai facile a constatarsi nelle parti centrali del disco, di lamine, sorgenti in mezzo alla trama fibrillare intercellulare, accostate alle cellule in modo da parerne fino a un certo punto dipendenti. Sono visibili sufficienti gradi di passaggio per dimostrare che le lamine e le fibre non hanno un modo di originarsi diverso, ma piuttosto rappresentano due stadii successivi di uno stesso processo. Le lamine fanno assumere alla zona del disco intermedia fra la centrale e la periferica un aspetto tale, che alcuni AA. (Disse, O. Schultze) parlano di uno stadio precartilagineo, o anche cartilagineo del *lig. intervertebrale.* Retterer nega questo stadio e a me non accadde di osservarlo, è però certo che in un preparato col metodo di Bielschowsky-Levi in cui le cellule siano poco evidenti e appaia invece bene la trama fibrillare, si trova una notevole somiglianza tra la zona intermedia del disco e la cartilagine attigua (Fig. 3).

Le lamine formatesi nella zona pericordale si orientano, portandosi verso i corpi vertebrali, intorno alle cellule, che divengono più numerose e gradatamente di forma tondeggiante per passare alla cartilagine: quelle della zona intermedia passano nella cartilagine direttamente, mentre le fibre della zona più periferica vi giungono dopo essersi raccolte nuovamente in lamine.

Osserverò come le lamine, così penetrate nel disco, si possano seguire molto profondamente nella cartilagine, non si può anzi dire dove cessino, perchè tra le cellule piccole e numerose della zona di cartilagine confinante col disco troviamo dei setti di notevole densità, formati direttamente dalle lamine del disco; profondamente, ove le cellule sono un po' più distanti, i setti si risolvono nella sostanza fondamentale sotto forma di una tramula di fibrille di estrema finezza (Fig. 4), mentre a delimitare le cellule rimangono dei fasci un po' meno densi. Se a queste fibrille ne siano mescolate di simili, formatesi nella prima condrificazione diretta, che ha originato il corpo vertebrale, non si può stabilire; certo si è che tutta la sostanza fondamentale consta a quest'epoca di una trama fibrillare molto delicata, non paragonabile ad una rete con punti nodali ed anastomosi, poichè le fibrille a decorso ondulato pare solo che si accavallino. Le fibrille appaiono affatto indipendenti dalle cellule cartilaginee,

tanto negli strati profondi quanto nella zona di passaggio. Anche nella formazione dei gruppi isogeni, quando due cellule sono appena divise e queste cominciano ad allontanarsi, alcune fibrille si insinuano nel piccolo spazio che si forma tra le due cellule, e si avanzano sempre più profondamente e più numerose, formando una piccola lamina man mano che le cellule si allontanano; mentre apparirebbero subito fra le due membrane cellulari (sempre assai evidenti) per tutta l'estensione del loro contatto, se fossero un prodotto diretto della cellula. In periodi successivi quest' elegante trama, che si mette in evidenza facilmente con tutte le colorazioni elettive del collageno, viene mascherata: ricompare però sempre, e con questi precisi caratteri, nella sostanza fondamentale della cartilagine della zona di ossificazione, come fin dal 1877 LEBOUCQ aveva osservato. Ad essa ho voluto accennare, poichè, fra le tante formazioni, che a ragione o a torto furono interpretate come rappresentanti della sostanza collagena nella cartilagine jalina, merita certo considerazione. Invece essa è la più trascurata, limitandosi quasi tutti gli AA. a parlare di continuazione dei fasci connettivi del disco intervertebrale e in generale del pericondrio nella cartilagine, quale si vede ad esempio nella fig. 5ª riferentesi a stadii assai più avanzati. Qui i fasci collageni definitivi si arrestano in strati assai superficiali, e comparandoli con le fibrille che riappaiono nella zona di ossificazione, si può tosto rilevare come, almeno per la struttura, se non sostanzialmente, si tratti di due formazioni del tutto diverse.

Frequentissimi e ben riconoscibili sono gli artefatti provocati dai reagenti in queste esili fibrille; essi consistono essenzialmente in accollamenti nel senso della lunghezza, e, da soli, furono rilevati da molti AA., che interpretarono variamente questi, come gli artefatti di altra natura, facilissimi a prodursi nella cartilagine jalina. HANSEN e STUDNICKA se ne occuparono, dando loro il nome di *pseudostrutture*, ad indicare che esse non sono *preformate*, ma *predisposte*. Voglio però osservare che STUDNICKA considera come artefatti delle particolarità che forse non lo sono, così i prolungamenti cellulari, che, descritti da molti AA. (COLOMIATTI, TIZZONI, VOGEL, VAN DER STRICHT, FUSARI, LIONTI, SRDINKO, ecc.), si possono benissimo spiegare, almeno in molti casi, e nel nostro quando si trovano nelle parti più

vicine al disco intervertebrale, come cellule connettive che non hanno ancora compiuta la loro evoluzione in cellule cartilaginee durante la produzione della cartilagine d'apposizione.

Avanzando nello sviluppo, senza che per un certo tempo siano profondamente modificate le condizioni descritte, si estende maggiormente la zona pericordale e in essa aumenta notevolmente il numero delle cellule, dei loro prolungamenti e delle anastomosi, che le collegano. Questa zona si può considerare come il centro germinativo del disco intervertebrale, poichè qui appunto appaiono i primi fenomeni di produzione delle fibrille, ciò che del resto già implicitamente fu notato da HANSEN. Ora qui appunto, a partire dal feto di 92 mm. della mia serie, si rende evidente una nuova e ben più attiva produzione di fibrille collagene, che presto assumono i caratteri tipici delle fibrille definitive (aggruppamento in fasci, decorso ondulato). Questa nuova produzione avviene secondo un processo alquanto differente, almeno nei particolari, da quello sopra descritto. Le particolarità che erano fino ad ora visibili nella sostanza fondamentale gradatamente si fanno meno evidenti, per lasciar posto (fig. 6ª, feto di 112 mm.) ad una struttura reticolare, perfettamente analoga a quella del protoplasma perinucleare; quest'ultimo si distingue solo per una densità e una colorabilità un po' maggiore. Vi ha anzi uno stadio, invero molto fuggevole, in cui non si può neppure rilevare la lieve differenza tra il protoplasma perinucleare e il metaplasma della sostanza fondamentale, per il che possiamo ritenerci di fronte ad un sincizio quasi tipico. Specialmente nelle parti laterali della zona pericordale si notano nel sincizio delle modificazioni di colorabilità per cui nelle sezioni frontali appaiono alcune striscie arciformi, con la concavità guardante verso i resti della corda (notevolmente aumentati di volume, ma ancora ben delimitati), striscie che hanno assunta la colorazione tipica delle fibre collagene, ad esempio un colore lilla caratteristico con l'ematossilina MALLORY-RIBBERT. Di fronte a questo reperto, a parte le differenti condizioni, dipendenti dal genere diverso di tessuto studiato, non si può far a meno di pensare al *precollageno* di LAGUESSE, nel quale sorgeranno le fibrille collagene definitive.

Basta infatti passare a parti più periferiche, per vedere tosto gli archi colorati come collageno, alternati con altri, colo-

rati semplicemente come protoplasma comune, farsi sempre più frequenti e disegnarsi in essi dei fascetti di fibrille.

Non mi riuscì di poter stabilire il destino delle lamine e delle fibre diritte ed isolate che caratterizzavano il tessuto nei primi periodi dello sviluppo. Sono esse ricacciate negli strati assolutamente più periferici, o, almeno per ciò che riguarda le lamine, vengono mascherate o forse anche utilizzate per la formazione del nuovo sincizio? Io non ne vidi più traccia alcuna nè in questo stadio nè nei successivi.

Altrettanto utili e dimostrative sono le sezioni trasversali. Alcuni punti della zona pericordale presentano ancora lo stato sinciziale; appaiono cioè i nuclei, circondati da un protoplasma nettamente reticolare, con vacuoli evidentissimi e con diversi prolungamenti, il quale si perde gradatamente in un metaplasma più pallidamente colorato, pure reticolare e vacuolizzato. Si può assistere alla graduale fibrillazione del metaplasma intercellulare dapprima (parti centrali del disco) e poi dei prolungamenti e perfino degli interi corpi cellulari (parti periferiche). L'accrescimento e la fusione dei vacuoli appaiono fattori concomitanti della formazione delle fibrille (fig. 7ª, feto di mm. 141): questo ci richiama alla mente che, fin dal 1871, ROLLET aveva attribuito la formazione delle fibrille al modo di comportarsi degli spazi che si determinano nel metaplasma da lui descritto come *Prägung* delle fibrille stesse.

Le fibre si producono dapprima nella parte del sincizio che reagisce come collageno, ma poi anche in quella che reagisce solo come protoplasma; la picrofucsina di HANSEN mette bene in evidenza soltanto la parte collagena.

Quanto HANSEN ha descritto in stadii più avanzati (nei quali, come ho potuto controllare su due feti di 40 cm. circa non considerati nella serie, i fatti, che ora descrivo, si manifestano ancora) mi pare sia soltanto una parte del fenomeno complessivo. Posseggo infatti dei preparati alla picrofucsina, secondo il metodo di questo A., in cui il mantello di fibrille intorno alle cellule (ectoplasma di HANSEN) è evidente, mentre assai meno chiare sono le altre particolarità. HANSEN in vero accenna al fatto che nel disco intervertebrale ci sono fibrille connettive che hanno origine estracellulare, ma non si ferma a spiegare per qual processo esse si formino.

Procedendo, nell'esame delle sezioni trasversali, dal centro alla periferia si vedono le cellule farsi sempre più piccole e le fibre sempre più stipate e più ordinate secondo strati concentrici, e fra di esse aumenta progressivamente il numero di quelle che reagiscono come collageno definitivo. Il metodo più utile per la dimostrazione di questo stadio è quello dell'ematossilina HEIDENHAIN differenziata con picrofucsina HANSEN.

In stadii successivi non si osservano modificazioni notevoli; seguita la produzione di fibrille nel modo ora indicato, e, siccome per molto tempo il sincizio pericordale non scompare, bisogna ammettere che veramente esso sia il focolaio di produzione della sostanza generatrice di fibrille. Queste aumentano enormemente di numero per le nuove aggiunte, e forse anche perchè crescono e si moltiplicano indipendentemente le già formate (HEIDENHAIN).

La cavità contenente i resti della corda, che si dilata ancora e perde i suoi limiti netti, su sezioni frontali appare circondata dallo strato sinciziale; intorno a questo sono dei fasci connettivi già sviluppati a decorso ellittico, che lo limitano anche verso la cartilagine; la zona esterna (*annulus fibrosus*) presenta numerosissimi strati ad arco, a cui i fasci collageni, tagliati obliquamente, dànno l'aspetto penniforme già ricordato.

Nel feto di 220 mm. si osserva che alcune cellule dello strato di fibre a decorso ellittico vengono a trovarsi in cavità ben delimitate dalle fibre collagene; così esordisce la formazione delle cellule cartilaginee, prima che esse si circondino delle caratteristiche capsule, secondo il processo descritto da HANSEN, per cui il disco, fin qui formato di puro tessuto connettivo fibroso, passa, in qualche parte almeno, ad una struttura fibrocartilaginea.

Il processo, per cui si formano i fasci collageni definitivi nel *lig. intervertebrale*, apparentemente si può ridurre allo schema di STUDNICKA. Le stesse figure che si osservano sui preparati vi corrispondono assai bene: però bisogna tener presenti alcuni fatti che in questo schema non sono considerati.

Il primo e più importante si è che le fibre, le quali presentano fin dall'inizio della loro formazione i caratteri del collageno, sorgono in determinate zone del sincizio che hanno modificata la reazione chimica, e sono così disposte da preludere già, almeno

in modo grossolano, alla direzione dei fasci futuri; zone che comprendono cellule e sostanza intercellulare. Perciò in questo caso sarebbe insufficiente ed inesatto limitarci a dire con Studnicka che le fibre si formano o si raccolgono nell'ectoplasma. Un secondo fatto notevole è l'accrescimento dei vacuoli durante la produzione delle fibre, sia quando queste sorgono nella sostanza intercellulare, sia quando sorgono nel corpo cellulare. Studnicka, attenendosi all'opinione di Flemming, ritiene le fibrille collagene omologhe delle fibrille protoplasmatiche di altre cellule (ad esempio delle cellule epiteliali) e le fa originare dapprima nell'intera cellula; solo più tardi esse si raccoglierebbero alla periferia costituendo l'ectoplasma. Le nostre osservazioni ci portano a ritenere, che esse si formino dapprima nel metaplasma intercellulare poi anche nel corpo cellulare secondo un processo analogo per ambedue i luoghi. Un terzo fatto notevole è che non tutte le fibre reagiscono fin dall'inizio come vero collageno, ma parecchie acquistano solo secondariamente questa reazione.

A proposito della cartilagine dei corpi vertebrali, senza fermarmi sui fatti già noti della penetrazione in essa dei fasci fibrosi del disco (fig. 5ª) e del pericondrio, ricorderò come sempre, anche negli stadii più avanzati da me presi in esame, la struttura a fini fibrille si smascheri nella zona di ossificazione.

Inoltre, a un certo periodo dello sviluppo, quando il centro di ossificazione del corpo vertebrale si è abbastanza avvicinato a quello dell'arco (feti di mm. 186-196) compare una struttura a lamine, che su sezioni trasversali ha l'aspetto di un reticolo. Per l'identità delle figure e della descrizione io non dubito punto che essa corrisponda (fig. 8ª) alla “*formation cloisonnante*„ di Renaut. La miscela di Mallory pel connettivo dimostra chiaramente la formazione in questione colorandola più intensamente che la sostanza fondamentale. Studnicka classifica anche questa fra le pseudostrutture, come del resto aveva fatto Hansen, e alcuni miei preparati di stadii precedenti appoggerebbero fino a un certo punto questa ipotesi. Vi contrasta però un fatto, ed è che il reticolo in determinati luoghi modifica la sua disposizione in modo veramente utile per la funzione.

Esso infatti, formato di maglie poligonali abbastanza regolari in quasi tutta l'estensione della sezione, consta di maglie

molto allungate tra il centro di ossificazione del corpo e quello dell'arco; così i pezzi di sostanza fondamentale inclusi nelle maglie, stretti ed allungati in direzione perpendicolare a quella della risultante delle forze, che possono sollecitare l'arco, hanno la disposizione più opportuna per distribuire equamente sul corpo vertebrale le pressioni trasmesse dall'arco.

Non escludo che si possa trattare di accollamento di fibrille mascherate dalla sostanza condromucoide basofila, ma non è del tutto improbabile che questo accollamento, anzichè essere artificiale, rappresenti una preformata struttura funzionale.

*
* *

Volendo riassumere abbiamo visto che nel *ligamentum intervertebrale* si possono seguire due periodi istogenetici ben distinti, caratterizzati da un diverso modo di formarsi e di presentarsi delle fibre collagene.

Nel *primo periodo* vediamo sorgere una trama di fibrille elementari, che si compongono successivamente in lamine e fibre, paragonabile a quella descritta da RENAUT. Si devono però fare delle riserve sul modo di considerare la sostanza fondamentale intercellulare, in cui compaiono le fibrille: essa non si può intendere come un prodotto di secrezione amorfo ed inerte, ma deve ritenersi come un vero *metaplasma*. Le fibre mature in questo periodo sono sempre piuttosto grosse, liscie, quasi perfettamente rettilinee, non mai raccolte in fasci.

Durante lo svolgersi di questo periodo, la cartilagine dei corpi vertebrali cresce rapidamente per apposizione di nuovi strati da parte del disco, e in questo accrescimento del tessuto cartilagineo per apposizione vi si stabilisce la trama collagena. Questa è destinata a persistere con gli stessi caratteri anche durante il secondo periodo dello sviluppo del disco.

Nel *secondo periodo* istogenetico del disco intervertebrale la formazione delle fibre collagene avviene in seno ad un sincizio, nel quale possiamo ben presto distinguere un *protoplasma* perinucleare, che costituisce delle cellule ramificate, ed un *metaplasma* che costituisce la sostanza fondamentale intercellulare. Le fibre possono formarsi in una parte del sincizio che reagisce già come collageno, oppure nel sincizio stesso allo stato primitivo,

e assumere dopo le reazioni del collageno. Esse a completo sviluppo sono sottili, ondulate, sempre raccolte in fasci.

Molti dei singoli fatti, che ebbi occasione di rilevare, concordano con l'una o con l'altra delle teorie fino ad oggi emesse sull'istogenesi delle fibre collagene, e ciò prova che le divergenze piuttosto che ad errori di interpretazione, od all'osservazione di artefatti prodotti dai reattivi sono imputabili a incompiutezza di osservazione. Potremo cercare la regola generale, se pure esiste, che presiede alla formazione di tutte le fibre collagene, solo quando conosceremo completamente l'istogenesi di tutti gli organi che ne contengono.

Dall'Istituto anat. dell'Univ. di Torino, diretto dal prof. Romeo Fusari.
Dicembre 1908.

BIBLIOGRAFIA

Per brevità citerò soltanto, fra i molti lavori consultati, quelli più recenti e che contengono delle rassegne riassuntive sull'istogenesi del tessuto connettivo, segnando con asterisco (*) quelli che contengono anche gli elenchi bibliografici più completi.

Ebner, *Die Chorda dorsalis der niederen Fische und die Entwicklung des fibrillären Bindegewebes,* " Zeitschrift f. wiss. Zoologie ", Bd. 62, pag. 469, 1897.

— *Ueber die Entwicklung der leimgebenden Fibrillen, inbesondere in Zahnbein,* " Sitzungsber. der kaiserl. Akad. der Wissenschaften in Wien. Math.-naturw. Klasse ", Bd. 115, Abt. 3, pag. 285, 1906.

*Flemming, *Die Histogenese der Stützsubstanzen, ecc.*, in " O. Hertwig's Handbuch der vergleich. und experim. Entwickelungslehre der Wirbeltiere ", Bd. III, Th. II. Jena, 1906.

Fusari, *Trattato elementare di Istologia generale*, Torino, 1909.

Fusari e Monti, *Compendio di Istologia generale*, Torino, 1891.

*Golowinski, *Zur Kenntniss der Histogenese der Bindegewebsfibrillen,* " Anatomische Hefte ", H. 99 (Bd. 33 H. 1), 1907.

*Hansen, *Untersuchungen ueber die Gruppe der Bindesubstanzen :* I. *Der hyalin Knorpel,* " Anatomische Hefte ", H. 83 (Bd. 27 H. 3), 1905.

*Heidenhain, *Plasma und Zelle :* I. *Allgemeine Anatomie der lebendigen Massen,* in " Bardeleben's Handbuch der Anatomie des Menschen ", Jena, 1907.

*LAGUESSE, *Sur l'histogenèse de la fibre collagène et de la substance fondamentale dans la capsule de la rate chez les Sélaciens*, "Archives d'Anatomie microscopique „, T. 6, pag. 99, 1903-04.

PRENANT, BOUIN e MAILLARD, *Traité d'Histologie*, T. 1, Paris, 1904.

RENAUT, *Traité d'Histologie pratique*, T. 1, Paris, 1893.

RETTERER. Si consultino di questo A. i numerosi lavori contenuti in: " Journal de l'Anatomie et de la Physiologie „, annate 1892 e 1900; " C. R. de la Soc. de Biologie „, annate 1899. 1905, 1907, 1908; " C. R. de l'Association des Anatomistes „, Montpellier, 1902; " C. R. de l'Acad. des Sciences „, Paris, 1908 (N. 1).

*SPULER, *Beiträge zur Histiologie und Histiogenese der Binde- und Stütz-Substanz*, " Anatomische Hefte „, H. 21 (Bd. 7, H. 1), 1896.

STUDNICKA, *Sckematische Darstellungen zur Entwickelungsgeschichte einiger Gewebe*, " Anat. Anzeiger „, Bd. 22, pag. 537, 1903.

*— *Histologische und histogenetische Untersuchungen über das Knorpel, Vorknorpel und Chordagewebe*, " Anatomische Hefte „, H. 67 (Bd. 21, H. 2), 1903.

*SZILY, *Ueber des Entstehen eines fibrillären Stützgewebes im Embryo und dessen Verhältniss zum Glaskörperfrage*, " Anatomische Hefte „, H. 107 (Bd. 35, H. 3), 1908.

Per quanto riguarda l'istogenesi del *lig. intervertebrale* in particolare citerò:

DISSE, *Skeletlehre* (*Wirbelsäure, Thorax*), in " Bardeleben's Handbuch der Anatomie des Menschen „, Jena, 1896.

FICK, *Gelenke*, ibidem, Jena, 1904.

HANSEN, *Ueber die Genese einiger Bindegewebsgrundsubstanzen*, " Anatom. Anzeiger „, Bd. 26, pag. 417, 1899.

KÖLLIKER, *Handbuch der Gewebenlehre des Menschen*, Bd. 1, Leipzig, 1889.

— *Embryologie* (versione francese di A. SCHNEIDER), Paris, 1882.

ROBIN, *Dictionnaire enciclopédique des sciences médicales*. Voci: *Cartilage, Fibreux, Rachis*.

— *Mémoire sur le développement des vertèbres*, " Journal de l'Anat. et de la Phys. „, 1864, pag. 274.

SCHNEIDER, *Lehrbuch der vergleich. Histologie*. Jena, 1902.

SCHULTZE O., *Grundriss der Entwicklungsgeschichte des Menschen und der Säugethiere*, Leipzig, 1897.

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE

Fig. 1ª. — Zona pericordale del disco intervertebrale di un embrione bovino di mm. 33. Sezione frontale. *Fissazione*: ZENKER; *colorazione*: *ematossilina* MALLORY-RIBBERT e *safranina base* (CURTIS); imm. omog. $^1/_{12}$, ZEISS, tubo mm. 160, oc. 4.

Fig. 2ª. — Sezione frontale vicina alla superficie ventrale del disco intervertebrale di un embrione bovino di mm. 49. *Fissazione e colorazione* come sopra, imm. omog. 1,5 mm., ap. 1,30, ZEISS, tubo mm. 160, oc. 8 comp.

Fig. 3ª. — Parte del disco intervertebrale (*d*) e della cartilagine del corpo vertebrale (*c*) di un embrione bovino di mm. 55. Sezione frontale. *Fissazione*: ZENKER ; *colorazione* : BIELSCHOWSKY-LEVI ; imm. omog. $^1/_{12}$, ZEISS, tubo mm. 160, oc. 4.

Fig. 4ª. — Particolare della sostanza fondamentale della cartilagine nel preparato precedente, imm. omog. 1,5 mm., ap. 1,30, ZEISS, tubo mm. 160, oc. 8 comp.

Fig. 5ª. — Passaggio dal disco intervertebrale (parti periferiche) alla cartilagine. Feto bovino di mm. 92. Sezione frontale. *Fissazione*: ZENKER; *colorazione* : *ematossilina* MALLORY-RIBBERT; imm. omog. $^1/_{12}$ ZEISS, tubo mm. 160, oc. 6 comp.

Fig. 6ª. — Disco intervertebrale di un feto bovino di mm. 120. Sezione frontale della zona pericordale. *Fissazione e colorazione* come sopra; imm. omog. $^1/_{12}$, ZEISS, tubo mm. 160, oc. 4.

Fig. 7ª. — Cellule con vacuoli in cui si originano delle fibre collagene. Disco intervertebrale di feto bovino di mm. 141 Sezione trasversale. *Fissazione*: ZENKER; *colorazione*: *ematossilina ferrica* HEIDENHAIN e *picrofucsina* HANSEN ; imm. omog. $^1/_{12}$, ZEISS, tubo mm. 160, oc. 4.

Fig. 8ª. — Sezione trasversale del corpo di una vertebra lombare di un feto bovino di mm. 196. Dimostra la *formation cloisonnante* di RENAUT a maglie poligonali in basso, a maglie allungate in alto, tra il centro di ossificazione del corpo (*a*) e quello dell'arco (*b*). *Fissazione*: ZENKER; *decalcificazione*: *acido tricloroacetico*; *colorazione*: *miscela di* MALLORY, ob. 5 Koristka, oc. 4.



BRUNI A.C.- Contributo alla conoscenza dell'istogenesi delle fibre collagene.

Fig. 1

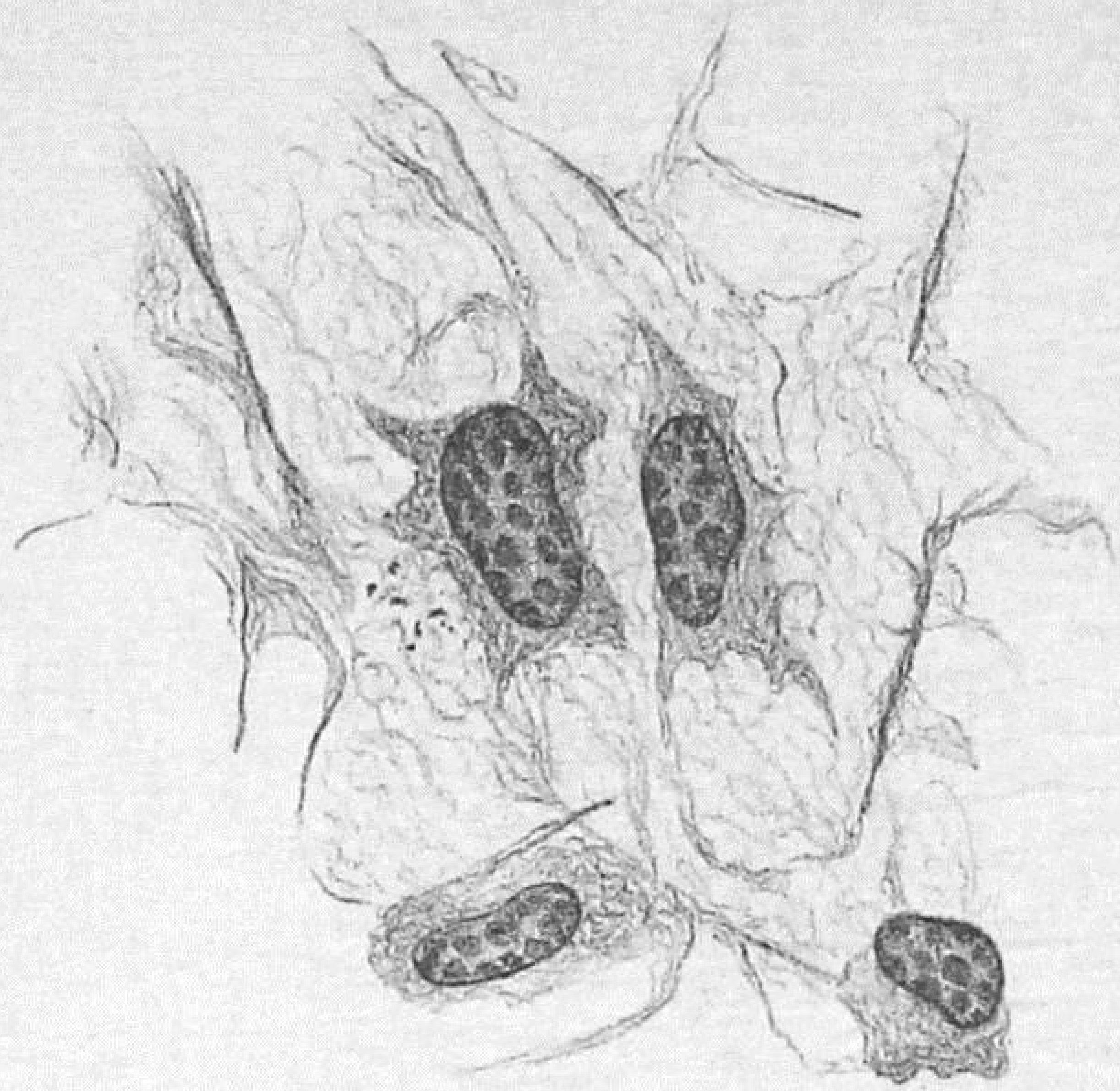


Fig. 2

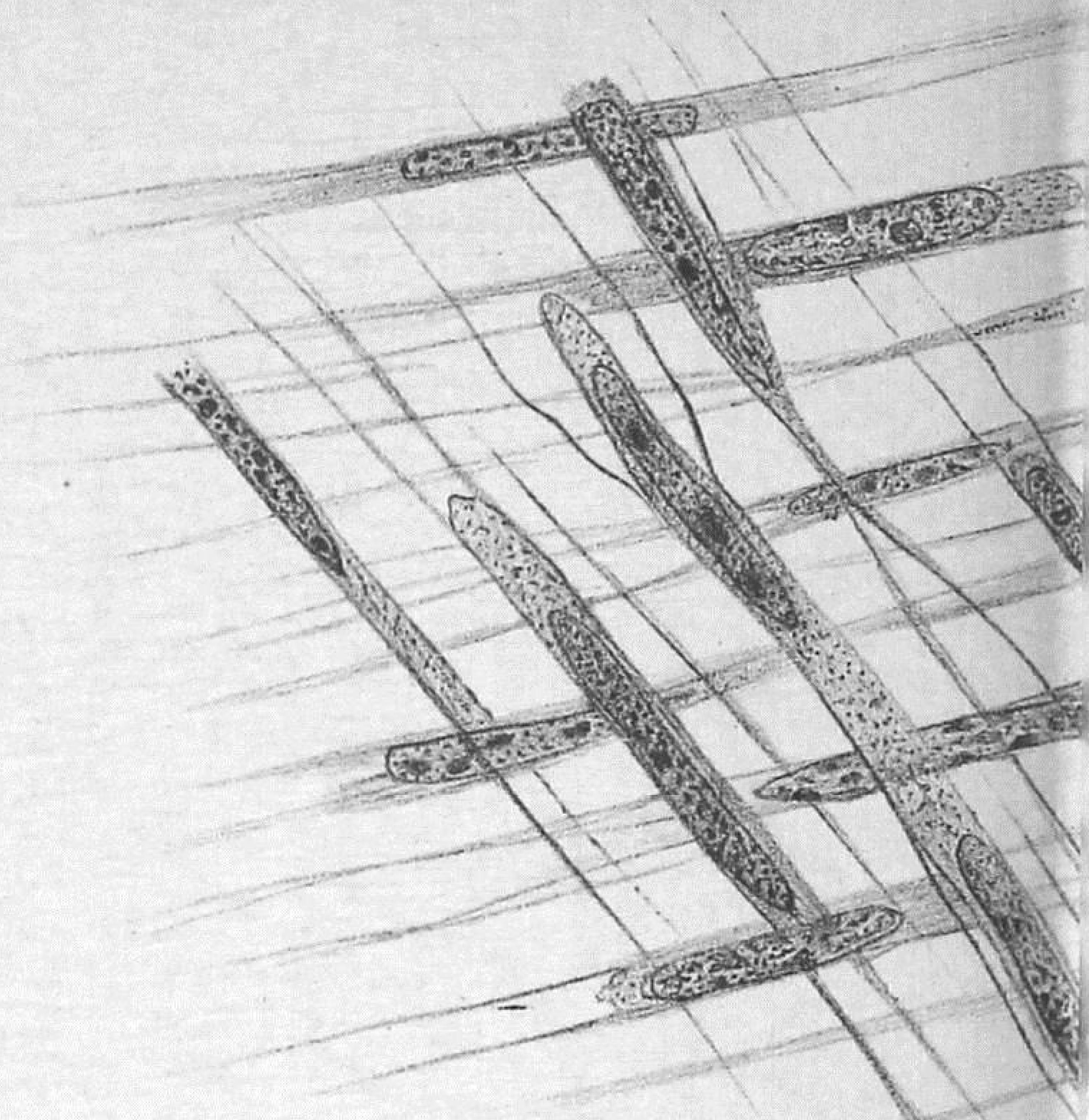


Fig. 4

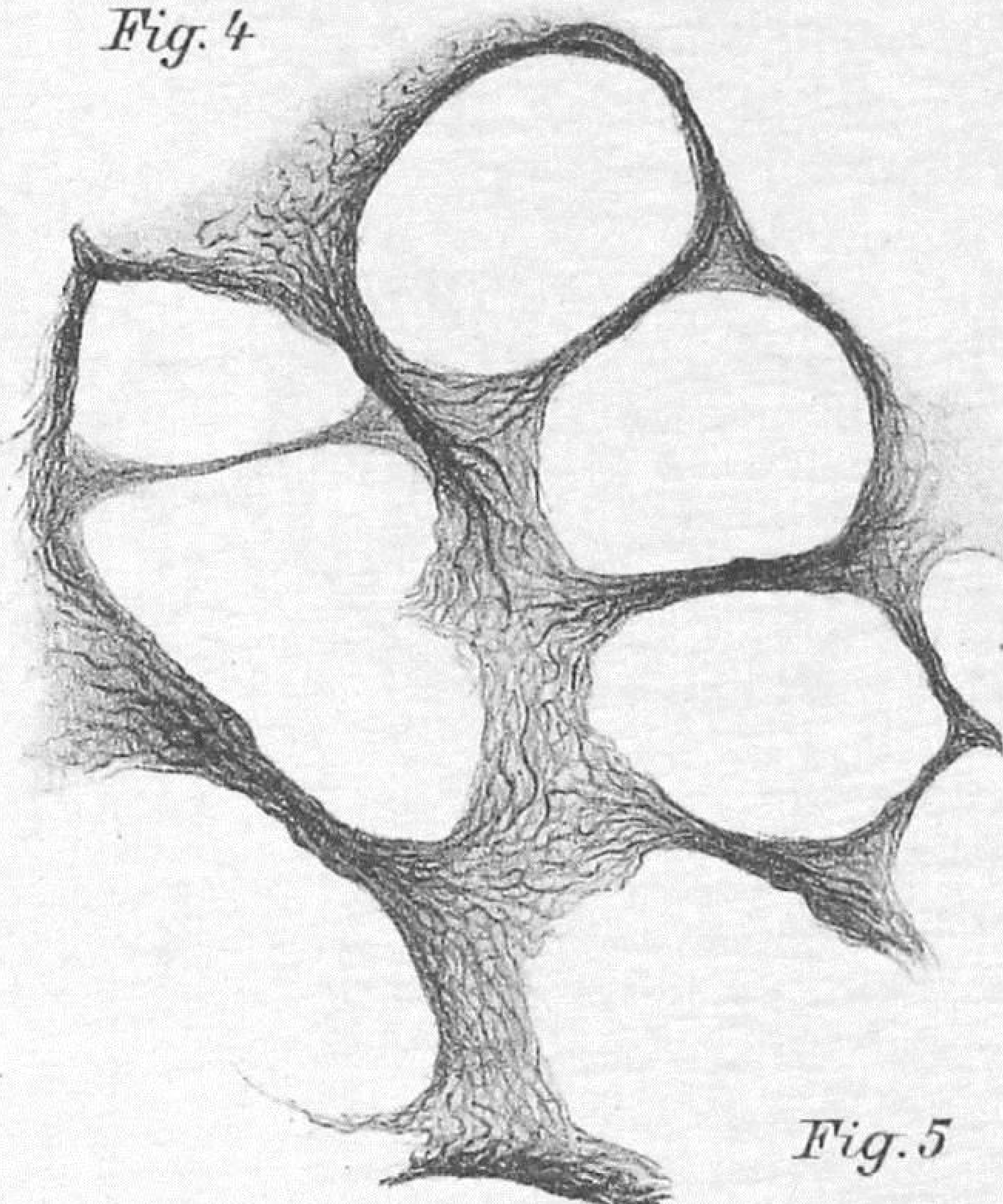


Fig. 7

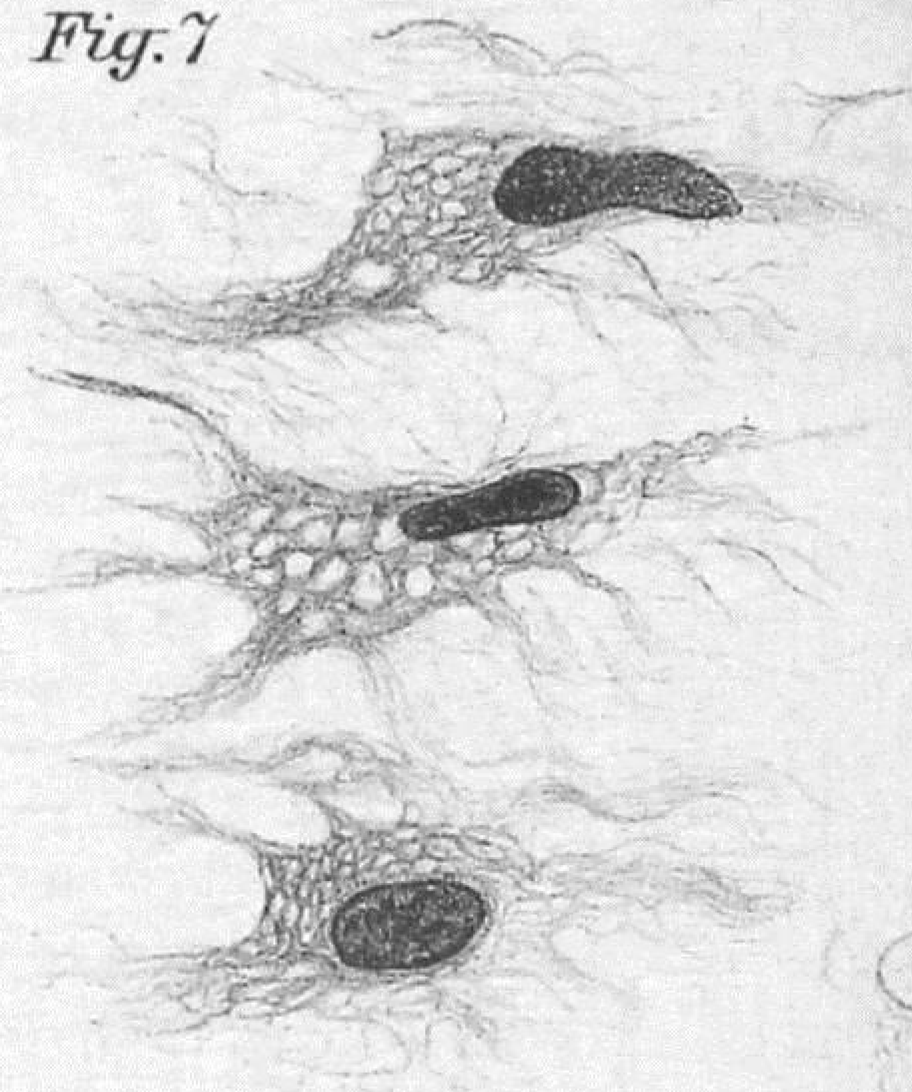
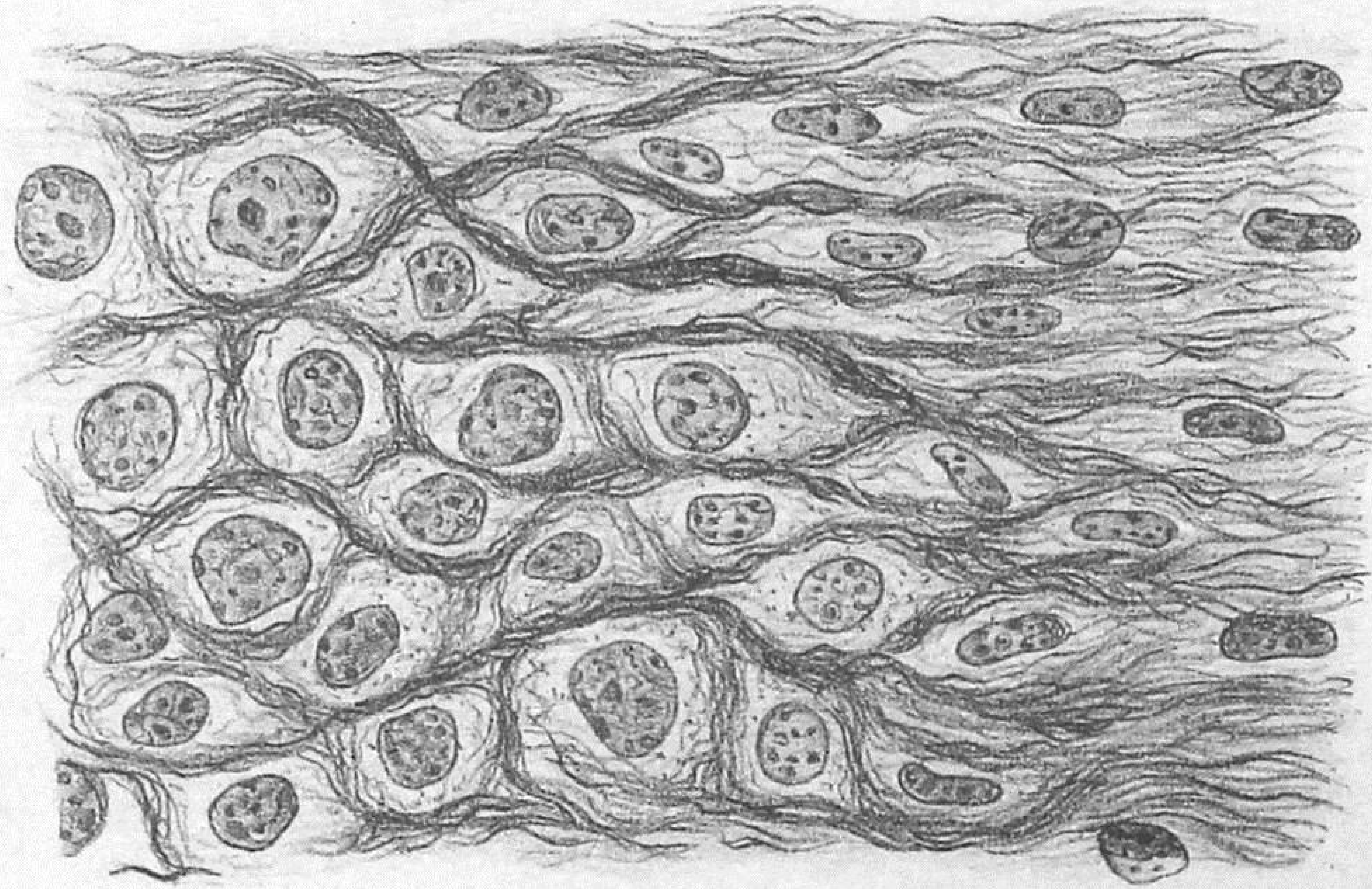


Fig. 5



F

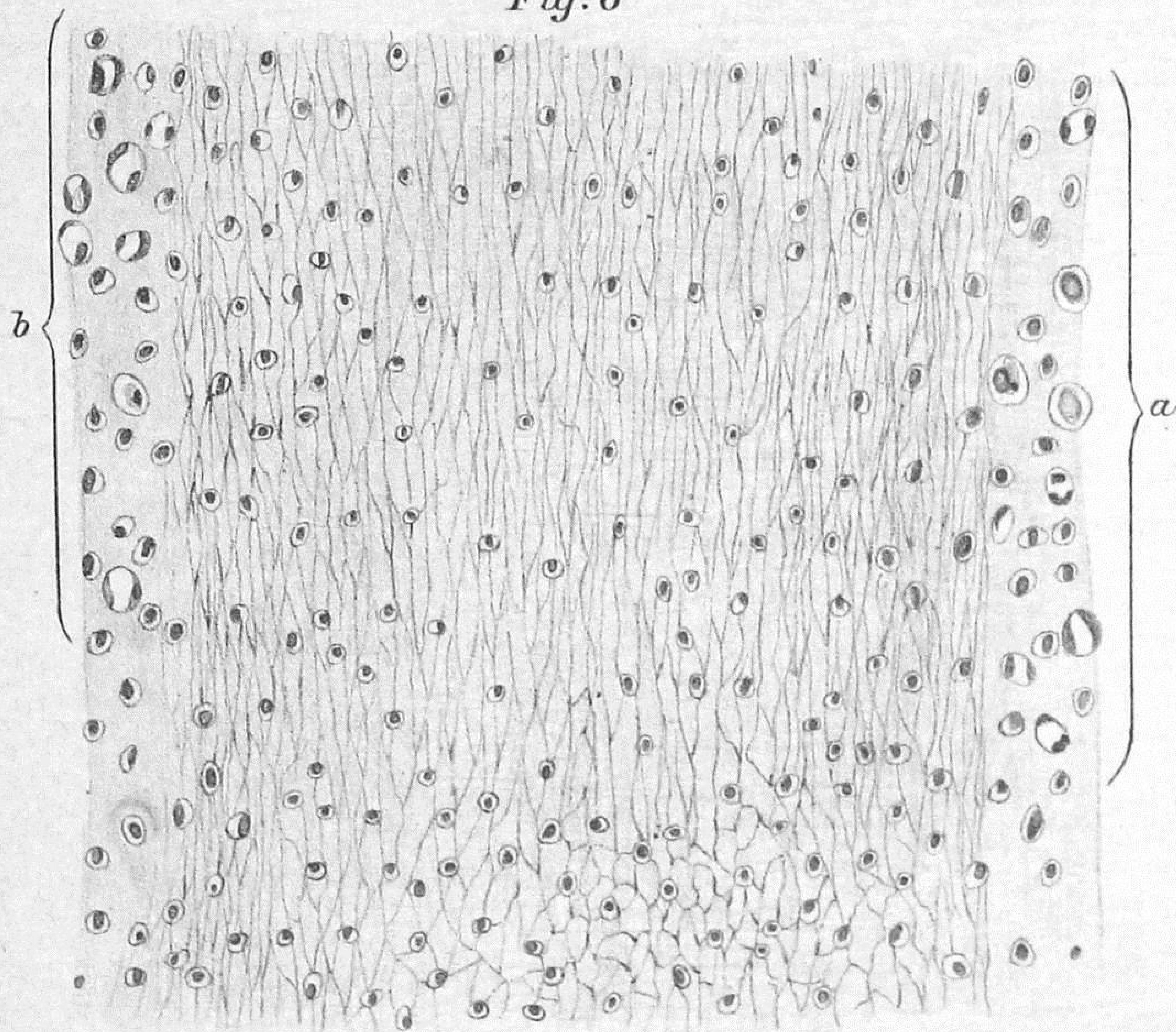


Fig. 3

d

c

Fig. 8



Lit. Salussolia, Torino